12-11

One-step RT-PCR Kit

RT-PCR Quick Master Mix

(Code No. PCR-311)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3647K

― 目 次 ―

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

RT-PCR Quick Master Mix は、*Thermus thermophilus* HB8 株由来の組換型耐熱性 DNA ポリメラーゼである rTth DNA Polymerase が、2 価のマンガンイオン(Mn^{2+})存在下において強い逆転写活性を示すことを利用した、1 酵素系によるワンステップ RT-PCR 用 2x マスターミックスです。逆転写反応と PCR とを同一の反応系で連続的に行うため、試薬の分注操作が 1 回で済み、ハイスループット化に適しています。また、サンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

◆本製品の特長◆

1. 逆転写反応と PCR を同一の反応系で実施

RT-PCR Quick Master Mix は、RNA を鋳型として、逆転写反応と PCR を同一の反応系で連続的に行うため、実験系の迅速化、ハイスループット化に適しています。またサンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

2. 立体構造を取りやすい RNA 鋳型や、GC-rich な標的配列にも対応

RT-PCR Quick Master Mix は、逆転写反応と PCR を単一の耐熱性酵素 rTth DNA Polymerase で行います。耐熱性酵素を用いた逆転写は、一般の逆転写酵素と比較して、反応を高温で実施できるため、立体構造をとりやすい鋳型 RNA の反応に適しており、また、遺伝子特異的プライマーのプライミングの特異性も高めます。更に、rTth DNA Polymerase は GC-rich な配列の増幅に有効であることが知られており、高い増幅効率を期待することができます。

3. 高速ホットスタート

RT-PCR Quick Master Mix は、抗 DNA ポリメラーゼ抗体を用いたホットスタートシステムを採用しています。抗体を用いたホットスタートは非特異反応の抑制に強力な効果を示し、また、加熱によって速やかに抗体が失活するため、酵素の再活性化も迅速であり、鋳型 RNA や酵素への高温によるダメージを最小限に抑えることができます。

※ご注意

本製品では、マグネシウムイオン(Mg^{2+})の代わりにマンガンイオン(Mn^{2+})を使用しており、PCR における正確性(Fidelity)が低下しています。そのため、PCR 増幅産物に変異が入りやすく、遺伝子クローニング等を目的としたご使用には薦めできません。高い正確性を要求する RT-PCR を行いたい場合には、弊社 2-step RT-PCR キット「ReverTra-Plus-™」をご使用ください。(**[7] 関連商品**の項を参照)。

[2] 製品内容

本製品には、以下のパーツが含まれています。

品名および内容	保存	容量
2x RT-PCR Quick Master Mix	-20°C (または 4°C で 2 ヶ月以内)	625μl×2
50mM $Mn(OAc)_2$	-20°C	200μl
Nuclease-free Water	-20°C	1100μl
Positive Control RNA (human G3PDH mRNA, 5×10^5copies/μl)	-20°C	50μl
Control Primer F (10pmol/μl)	-20°C	50μl
Control Primer R (10pmol/μl)	-20°C	50μl

2x RT-PCR Quick Master Mix

・反応バッファー、dNTPs、rTth DNA ポリメラーゼ及び抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含んだ 2x の PCR 反応溶液です。鋳型 RNA、プライマー、$Mn(OAc)_2$ 溶液を添加し、Nuclease-free Water で 1x 濃度に調製して使用してください。
・融解後はゆるやかに混和し、溶液を均質化した上でご使用ください。
・使用後は、-20°C で再度凍結保存してください。凍結融解の繰り返しは、10 回程度を上限とし、一度の使用量が少ない場合は、小分注して保存してください。
・短期間(おおよそ 2 ヶ月以内)であれば、冷蔵(4°C)保存することもできます。

50mM $Mn(OAc)_2$

・反応に必要なマンガンイオンの溶液です。通常は反応系に 1/20 volume (終濃度 2.5mM)となるように添加します。
・ターゲットとなる RNA の濃度や種類によっては、添加量を増減させることによりパフォーマンスが向上する場合があります。増幅が弱い場合は添加量を増加、非特異増幅が多い場合には添加量を減少させてください。
・-20°C で保存してください。

Nuclease-free Water

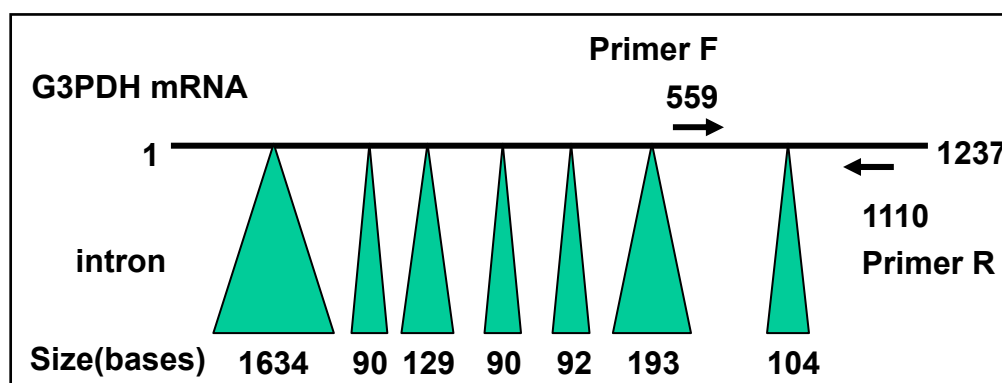
・フィルターろ過により DNase、RNase を除去した Nuclease-free グレードの滅菌蒸留水です。
・ポリメラーゼ活性に影響を及ぼす恐れのあるジエチルピロカーボネート(DEPC)処理を行わずに調製されています。

Control Primer F, Control Primer R (10pmol/μl)

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G3PDH または GAPDH)に対する配列特異的プライマーです。このプライマーセットは、G3PDH の２つのエクソンにまたがる約450bp の領域(mRNA、cDNA の場合)を増幅します。添付の Positive Control RNA と併せ、RT-PCR の反応系におけるポジティブコントロールとして用いることができます。

また、G3PDH は様々な哺乳類の組織で発現しているハウスキーピング遺伝子であり、その発現レベルは一部のサイトカインやフォルボールエステルなどを含む誘導物質によっても影響を受けず、一定していることが知られています。従って、種々の組織から抽出した total RNA や poly(A)$^{+}$ RNA を用いて実験を行う際に、内部参照として使用することができます。このプライマーセットは、ヒト、マウス、ラット、ブタ等の G3PDH に対して用いることが出来ます。

プライマーの配列

Control Primer F ： 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (20mer)
Control Primer R ： 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (20mer)

G3PDH用コントロールプライマーのアニーリング位置

Positive Control RNA (human G3PDH mRNA, 5×10^{5}copies/μl)

in vitro 転写されたヒト由来 G3PDH mRNA です。末端には 22mer の poly(A) tail が付加されています。添付の Control Primer F および Control Primer R と併せて RT-PCR の反応系におけるポジティブコントロールとして用いることができます。

[3] 使用方法

標準的なプロトコルを示します。

(1)反応液の調製

反応液組成(一例)

Nuclease-free Water	
2x RT-PCR Quick Master Mix	25 µl
50mM $Mn(OAc)_2$	2.5 µl (終濃度 2.5mM)
Forward Primer	10~30 pmol (終濃度 0.2~0.6µM)
Reverse Primer	10~30 pmol (終濃度 0.2~0.6µM)
RNA sample	< 2.5µg (Total RNA の場合) < 500ng $(poly(A)^+$ RNA の場合)
Total volume	50 µl

※添付のプライマーセット、Positive Control RNA を用いる場合

Nuclease-free Water	16.5 µl
2x RT-PCR Quick Master Mix	25 µl
50mM $Mn(OAc)_2$	2.5 µl (終濃度 2.5mM)
Control Primer F (10pmol/µl)	2 µl (終濃度 0.4µM)
Control Primer R (10pmol/µl)	2 µl (終濃度 0.4µM)
Positive Control RNA (5×10^5copies/µl)	2 µl (10^6copies)
Total volume	50 µl

・Nuclease-free Water は添付のもの、もしくは自家調製、市販品の RNase-free グレードのもの (RNase-free 水)をご使用ください。フィルター濾過により調製された RNase-free 水の使用をお薦めします。ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を使用する場合は、DEPC の残留により反応が阻害されることがありますので、オートクレーブを十分に行って DEPC を完全に除去してください。また、RT-PCR に使用する RNase-free 水は、他の実験用とは別に保存し、共用しないでください。
・プライマーの添加量は最終濃度 0.2µM を基本とし、0.2~0.6µM を目安にご検討ください。増幅効率がよくない場合、添加量を増やすことにより収量が向上する場合がありますが、逆に入れすぎると非特異反応の原因となり、検出感度が低下する場合があります。
・$Mn(OAc)_2$ 添加量は最終濃度 2.5mM を基本としていますが、RNA サンプルの濃度や増幅ターゲットの配列によっては $Mn(OAc)_2$ 濃度を増減させることにより、より良好な結果を得ることができる場合があります。増幅が弱い場合は添加量を増加、非特異増幅が多い場合には添加量を減少させてください。
・RNA サンプルの添加量は、Total RNA であれば 2.5µg 以下、$poly(A)^+$ RNA (mRNA)の場合であれば 500ng 以下を目安としてください。過剰量の添加は反応効率低下の原因となる場合があります。

(2)PCR の実施

RT-PCR 温度設定(一例)

Denature	90°C	30 sec
	|	
RT	60°C	30 min
	|	
Denature	94°C	1 min
	|	
PCR	94°C	30 sec
(25~40	50-70°C	30 sec
cycles)	72°C	1 min
	|	
Elongation	72°C	7 min

・本製品では高速ホットスタートシステム(p.2 参照)を採用していますので、最初の変性ステップにおける酵素の再活性化は 90°C、30 秒間で十分に行うことができます。必要以上の加熱処理は、酵素活性を低下させ、また鋳型 RNA の安定性にも悪影響を及ぼす可能性があります。
・アニーリング温度は、Tm-5°C 程度を基本とし、ターゲットに応じて適宜変更してください。増幅が弱い場合は温度を低下、非特異増幅が多い場合には温度を上昇させることで結果が改善される場合があります。
・上記の条件は、ターゲット鎖長 100bp~1kb 程度の増幅に適しています。更に長いターゲットを増幅する場合は、PCR の伸長時間を延長します。

※鋳型 RNA について

・Total RNA

本製品では、Total RNA を直接、鋳型として用いることができます。AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法などの標準的な方法により精製された Total RNA には、ゲノム DNA が混入しています。ゲノム DNA の混入は、特に偽遺伝子が多く存在するターゲットを検出する際等に偽陽性シグナルを発生させる原因となりますので、必要に応じて、DNase I 等を用いてゲノム DNA を除去してください。

組織、培養細胞等から得られた Total RNA には、発現解析の対象となる mRNA が通常 1~2%程度含まれています。

・poly(A)$^+$ RNA (mRNA)

poly(A)$^+$ RNA は、oligo(dT)とのハイブリダイゼーションを利用して poly(A)$^+$末端を有する mRNA のみを選択的に分離したものです。精製段階で mRNA を濃縮できるため、mRNA を高感度で検出したい場合に有用です。ただし、Total RNA に比べてリボヌクレアーゼ(RNase)による分解を受けやすいため、取り扱いには注意してください。

[4] 実施例

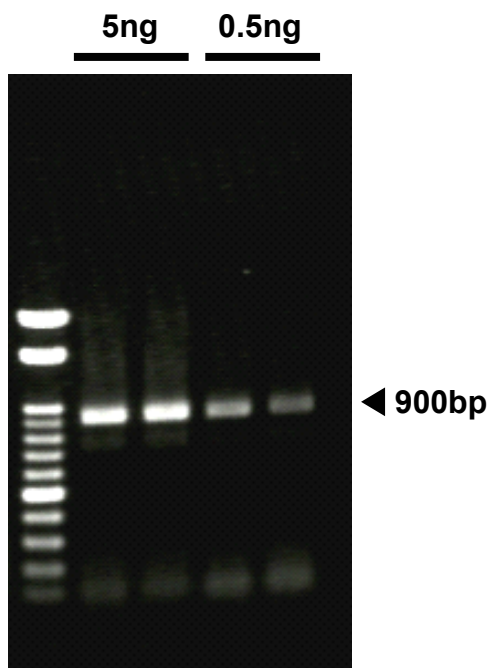
poly(A)$^+$ RNA からの mRNA の検出

HeLa 細胞由来の poly(A)$^+$ RNA を鋳型サンプルとして、human cdc2 mRNA ORF 全長の増幅を試みました。

(1)条件

サンプル:	HeLa 細胞由来 poly(A)$^+$ RNA 5ng または 0.5ng (50µl 反応あたりの添加量)		
ターゲット:	human cdc2 mRNA ORF (約 900bases)		
プライマー:	Forward:	'5- CCATACCATTGACTAACTATGGAAGAT -3' (27mer)	
	Reverse:	'5- GTCAGAAAGCTACATCTTCTTAATCTG -3' (27mer)	

PCR 条件:	Denature	90°C	30 sec
	RT	60°C	30 min
	Denature	94°C	1 min
	PCR	94°C	30 sec
	(40 cycles)	60°C	30 sec
		72°C	1 min
	Elongation	72°C	7 min

(2)アガロースゲル電気泳動による解析結果

poly(A)$^+$ RNA 量 5ng、0.5ng いずれにおいても、良好な増幅が認められました。

[5] 関連プロトコル

Total RNA の DNase I 処理

AGPC(Acid Guanidium-Phenol-Chloroform)法などの標準的な方法により精製された Total RNA にはゲノム DNA が混入しています。必要に応じて、下記の方法によりゲノム DNA を除去してください。

(1)反応液調製

反応液組成(一例)

Distilled Water (RNase-free grade)	
Total RNA	X µl
10x DNase I Buffer	1 µl
RNase-free DNase I (10U/µl)	0.5 µl
Total volume	10 µl

(2)反応と精製

上記反応組成液を調製し、氷上で 10 分から 30 分間静置して反応させます。
↓
反応液に 100µl の Distilled Water、100µl の TE 飽和フェノールを添加し、ボルテックス等で混合した後、氷上で 5 分間静置します。
↓
12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。
↓
100µl のクロロホルムを添加し、混合します。
↓
12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。
↓
5µl の 20mg/ml グリコーゲン(共沈剤)、100µl の 5M 酢酸アンモニウム、200µl のイソプロパノールを添加し、混合した後、-20°C で 30 分間静置します。
↓
12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。
↓
沈殿に 70%エタノールを加えます。
↓
12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。
↓
沈殿に適量の Distilled Water を加え、溶解します。

[6] トラブルシューティング

1. 電気泳動で目的のバンドが検出できない。

原因	対策
鋳型 RNA の純度が悪い、または分解している	鋳型 RNA を再調製してください。
鋳型 RNA の量が少ない	鋳型 RNA の添加量を増やしてください。
プライマーの Tm 値と PCR 条件とが合っていない	アニーリング温度を変更します。一般的に Tm 値より 5°C 低い温度が適切とされていますが、Tm 値は計算方法や PCR のバッファー組成によって変わることがありますので、アニーリング温度の条件を十分検討することをお薦めします。
プライマー濃度が低い	0.2~0.6μM の範囲を目安としてプライマー濃度を検討してください。また、Reverse Primer のみ濃度を 1μM 程度まで上げることにより、逆転写効率が改善される場合があります。
$Mn(OAc)_2$ 濃度が低い	通常は 2.5mM を反応系に添加しますが、濃度を上げることにより PCR 効率が上がる場合があります。

2. 非特異反応が多い

原因	対策
プライマーの濃度が高い	プライマーの濃度を 0.2μM まで、場合によってはそれ以下に下げてください。
プライマーの特異性が低い	プライマーを再設計してください。プライマーの GC 含量は 40~60%が適切です。プライマー内に相補的な配列がないこと、2 つのプライマーの 3'末端同士が相補的な配列でないことを確認してください。
$Mn(OAc)_2$ 濃度が高い	通常は 2.5mM を反応系に添加しますが、濃度を下げることにより非特異反応が減少することがあります。

3. ブランクサンプルでバンドが検出される

原因	対策
陽性サンプルや PCR 産物のコンタミネーション	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を更新してください。それでも発生する場合は、使用する蒸留水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。

[7] 関連商品

RNA 調製関連試薬

品名	内容	Code No.
磁性ビーズを用いる簡便な Total RNA 精製キット **MagExtractor™ -RNA-**	100 回用	NPK-201F
磁性ビーズによる精製を簡単に行う専用磁性スタンド ***Magical Trapper***	1 個	MGS-101

2-step RT-PCR 関連試薬

品名	内容	Code No.
高性能逆転写酵素 ReverTra Ace®と KOD Dash を組み合わせた高感度 2-step RT-PCR キット **ReverTra Dash®**	100 回用	PCR-401
高性能逆転写酵素 ReverTra Ace®と KOD -Plus-を組み合わせたクローニング等に最適な高正確性 2-step RT-PCR キット **ReverTra -Plus-™**	100 回用	PCR-501

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号 東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819 FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio